Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 277-289

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۲۸۹-۲۷۷

مقاله علمی- پژوهشی

ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی

محسن مجتهدی[1*]- محسن دانش مسگران[2]- مجید حیاتی آشتیانی[3]- سید علیرضا وکیلی[4]- سید مرتضی وقار سیدین[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۲

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 (AFB1) و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی پژوهشی در قالب دو آزمایش انجام گرفت. در آزمایش اول ابتدا تأثیر مقادیر مختلف AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز، پتانسیل تولید گاز، غلظت نیروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش یافت، ولی افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH نداشت. در آزمایش دوم تأثیر متقابل AFB1 و سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، مایکوباند و میلباند (در سطح ۶ درصد ماده خشک جیره) بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه با استفاده از روش کشت ثابت بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بر خلاف انتظار، هیچکدام از جاذب‌ها نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه ای در شرایط برون‌تنی را خنثی نموده و یا کاهش دهند که احتمالاً به‌دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکاته برای جذب AFB1 باشد. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی برای کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، برون‌تنی، تخمیر شکمبه‌ای، جاذب آلومینوسیلیکاته.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات بسیار سمی از دسته مایکوتوکسین‌ها هستند که دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌باشند. آفلاتوکسین B1 (AFB1) بخش عمده آفلاتوکسین‌ها را تشکیل داده و به‌عنوان قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی شناخته می‌شود (۲۶). هنگامی‌که خوراک‌های آلوده به آفلاتوکسین به حیوانات شیرده داده می‌شود، متابولیتی از آفلاتوکسین به‌نام M1 در شیر ترشح می‌شود. ازآنجا که پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و فرآوری شیر بر بقا و کاهش سمیت AFM1 تأثیر زیادی ندارد، این سم سرانجام به فرآورده‌های مختلف لبنی انتقال می‌یابد و سلامت مصرف کنندگان را به خطر می‌اندازد. در کنار تأثیرات منفی مایکوتوکسین‌ها بر سلامتی و محصولات تولیدی دام، این ترکیبات احتمالاً بر هضم، متابولیسم و جمعیت‌های میکروبی شکمبه نیز موثر خواهند بود. حد مجاز AFB1 در خوراک برابر ۵ میکروگرم در کیلوگرم و مقدار آفلاتوکسین‌های مخلوط (B1، B2، G1 و G2) ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم عنوان شده است (۲۰). از طرفی حد مجاز آفلاتوکسین M1 در ایالات متحده آمریکا ۵۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم است، که در ایران نیز همین میزان به‌عنوان مقدار استاندارد این توکسین در شیر در نظر گرفته می‌شود (۲۰).

در نشخوارکنندگان (به‌ویژه گاوهای شیرده) تغذیه شده با خوراک آلوده به AFB1 مشکلات سلامتی از قبیل سرطان کبد، تضعیف سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های تولیدمثلی، ناقص‌الخلقه‌زایی، کاهش مصرف خوراک و تولید شیر بروز می‌کند همچنین مشخص شده است

۱-استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
۲-استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳-استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کاشان
۴-دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵-دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(*-ایمیل نویسنده مسئول: mojtahedi@birjand.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75843

که آفلاتوکسین در نشخوارکنندگانی مثل گاو و گوساله باعث کوری، راه رفتن چرخشی و دایره وار، دندان قروچه، دهان کف آلود، التهاب قرنیه و پلک چشم، بیقراری، راه رفتن روی مفصل خرگوشی، اسهال، سقط جنین، تشنج و به دنبال آن زمین‌گیر شدن و در نهایت باعث مرگ می‌شود و از علائم کالبد شکافی می‌توان به افزایش آنزیم‌های کبدی اشاره کرد (۱۵،۲۷). شدت بروز سمیت و بیماری ناشی از آفلاتوکسین‌ها به مقادیر سم، مدت تغذیه و وجود دیگر تنش‌های اثرگذار بر حیوان، بستگی دارد. با این وجود تشخیص بیماری‌های ناشی از مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسیکوزیس به‌دلیل نداشتن علائم اختصاصی، مشکلات و هزینه‌های خاص نمونه گیری و آنالیز خوراک و برهم کنش با دیگر فاکتورهای تنش، مشکل می‌باشد.

برای غیرفعال کردن و یا کاهش اثرات آفلاتوکسین‌ها روش‌های زیادی بررسی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل جداسازی فیزیکی، غیر فعال کردن توسط حرارت، اشعه‌دهی، استخراج توسط حلال، تخریب شیمیایی، غیر فعال کردن توسط میکرب‌ها و تخمیر می‌باشد. روش‌های فوق تاحدودی قادر به غیرفعال کردن و کاهش آفلاتوکسین‌ها می‌باشند اما عمدتاً به‌دلیل ایجاد باقیمانده‌ها (کاهش ایمنیت) و کاهش کیفیت مواد غذایی، روش‌هایی عملی و قابل‌قبول نبوده‌اند. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که آسان‌ترین، عملی‌ترین و ارزان‌ترین شیوه در کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم قارچی یا جلوگیری از ورود این سموم در شیر و محصولات دامی استفاده از مواد جاذب یا مواد کمپلکس کننده در خوراک می‌باشد. ترکیبات جاذب مختلفی برای کاهش جذب آفلاتوکسین در خوراک و دستگاه گوارش حیوانات اهلی و به‌ویژه گاوهای شیرده استفاده شده‌اند، اما پرکاربردترین ترکیبات جاذب، ترکیبات معدنی آلومینوسیلیکاتی مانند بنتونیت‌ها هستند. بنتونیت‌ها ترکیبات نانوساختار و نانوحفره رسی هستندکه ساختار کریستالی لایه ای داشته و در جذب مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسین‌ها کاربرد دارند. همچنین مونتموریلونیت کانی نانو ساختار و نانو حفره‌ای آلومینوسیلیکاتی (فیلوسیلیکاتی) ۲:۱ لایه‌ای (T:O:T) است که فاز غالب تشکیل دهنده بنتونیت‌هاست وکلیه خواص و مشخصات بنتونیت‌ها را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. هاروی و همکاران (۱۵) گزارش نمودند که افزودن مقادیر مختلف آلومینوسیلیکات (HSCAS) به جیره‌های حاوی ۲۰۰ قسمت در بیلیون AFB1 منجر به کاهش ۲۴ درصدی در ترشح AFM1 شده است. استفاده از بنتونیت جهت جذب آفلاتوکسین برای اولین بار توسط ماسیمانگو و همکاران (۲۳) آزمایش شد. این محققین مشاهده کردند که افزودن ۲ درصد از چندین نوع بنتونیت در چندین محلول بافری باعث جذب ۴۰۰ میکروگرم AFB1 در دامنه ۹۴ تا ۱۰۰ درصد گردید. جیانگ و همکاران (۱۹) و همچنین هِلفریچ و همکاران (۱۶ و ۱۷) با بررسی سطوح مختلف AFB1 بر تولید گاز در شرایط برون‌تنی گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این ممانعت از تولید گاز را بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت تأثیر AFB1 عنوان نمودند. تاکنون مطالعه جامعی امکان کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم میکروبی شکمبه را بررسی نکرده است. بنابراین هدف از این آزمایش ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: تأثیر آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

در آزمایش اول تأثیر سطوح مختلف AFB1 شامل صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. برای تهیه محلول AFB1 ویال حاوی ۵ میلی‌گرم AFB1 خالص (کد ۶۶۳۶، شرکت Sigma-Aldrich) را با استفاده از متانول را با استفاده از متانول و آب مقطر دوبار تقطیر رقیق کرده تا محلول‌هایی به غلظت‌های ۱۵/۳ ، ۳۰/۶ و ۴۵/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر از AFB1 بدست آید.

مایع شکمبه قبل از خوراک وعده صبح از ۳ راس گاو نر هلشتاین دارای فیستولای شکمبه ای (تغذیه دو بار در روز و در سطح نگهداری با جیره حاوی ۷۰ درصد علوفه و ۳۰ درصد کنسانتره) گرفته شد و بلافاصله توسط ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید و به سرعت در فلاسک‌های حاوی آب گرم (حدود ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، به آزمایشگاه منتقل شد. سپس مایع شکمبه گرفته شده از سه گاو به نسبت مساوی با هم مخلوط شده و تا قبل از شروع انکوباسیون، در داخل حمام آب گرم ۳۹ درجه و در زیر جریان مداوم گاز دی اکسید کربن قرار گرفت.

در این آزمایش انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. تولید گاز بر اساس روش تئودور و همکاران (۳۹) و با استفاده از بطری‌های شیشه‌ای میلی‌لیتری مخصوص و فشارسنج اندازه گیری گردید. بدین‌منظور ۵۰۰ میلی‌گرم از خوراک پایه (جدول ۱) به داخل شیشه‌ها ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. لازم به ذکر است که خوراک پایه و مایع شکمبه مورد استفاده فاقد آفلاتوکسین بود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول‌های AFB1 مختلف تهیه شده در مرحله قبل به هر ویال افزوده شد تا غلظت‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم AFB1 در میلی‌لیتر محیط کشت، بدست آید. همچنین یک میلی‌لیتر از متانول رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمار صفر AFB1،

افزوده شد. سپس با تزریق گاز دی اکسید کربن به داخل شیشـه‌هـا، محیط داخل شیشه بی هوازی گردید و سپس درب شیشه‌ها فـورا بـا استفاده از درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی پرس گردیـد. سپس شیشه‌ها در بن ماری شیکردار ۱۲۰ لیتـری در شـرایط دمـایی (دمای۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد) و فیزیکی شبیه سازی شده بـر اسـاس شرایط شکمبه دام تحـت انکوباسـیون قـرار گرفتنـد و تولیـد گـاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و بر اساس کیلوپاسکال اندازه‌گیری شد و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (۱ اتمسفر و دمای صفر درجه سـانتی‌گـراد) تبـدیل شد. این روش انکوباسیون در ۲ نوبت (و ۸ تکرار برای هر تیمار در هر نوبت) انجام شد و در هر نوبت، سه شیشه فاقد نمونه خـوراک جهـت تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه و بافر، مـورد انکوباسـیون قرار گرفت.

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه (درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient and chemical composition of the main diet (% of Dry matter)

اجزا Ingredient	مقدار amount
علف خشک یونجه Alfalfa hay	15.0
سیلاژ ذرت Corn silage	30.0
دانه جو Barley grain	14.0
دانه ذرت Corn grain	10.0
کنجاله سویا Soybean meal	10.0
کنجاله تخم پنبه Cottonseed meal	8.0
سبوس گندم Wheat bran	7.0
پودر گوشت Meat powder	3.0
پودر چربی Fat powder	1.2
نمک salt	0.2
مکمل مواد معدنی و ویتامینی Mineral and vitamin supplements	1.6
ترکیب شیمیایی جیره **Chemical composition of diet**	
انرژی خالص شیردهی (مگاکالری در کیلوگرم) Net energy for lactation (Mcal/kg)	1.58
پروتئین خام (درصد) Crude protein	16.2
چربی خام (درصد) Crude fatty	3.8
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد) NFC	40.8
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد) ADF	20.3
الیاف نامحلول در شوینده خنثی(درصد) NDF	33.8

برای تعیین pH محیط کشت، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار محیط کشت و همچنین محاسبه قابلیت‌هضم ماده خشک به روش برون‌تنی، پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۴ شیشه کشت از هر تیمار را برداشته و به منظور متوقف کردن فعالیت میکروبی، شیشه‌ها بلافاصله به داخل ظرف آب سرد منتقل گردید. سپس به‌ترتیب شیشه‌ها باز شدند و pH محیط کشت با استفاده از pH متر دیجیتال (مدل۶۹۱، شرکت Metrohm) ثبت گردید. سپس محتویات شیشه‌ها با دقت به فالکون‌های ۵۰ منتقل شد و فالکون‌ها در دمای ۴ درجه و سرعت ۱۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع‌رویی هر فالکون با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ نرمال اسید کلریدریک مخلوط شده و جهت آنالیز نیتروژن آمونیاکی بعدی، در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. علاوه براین ۲ میلی‌لیتر دیگر از مایع‌رویی هر فالکون نمونه‌گیری و جهت آنالیز اسیدهای چرب فرار، منجمد و نگهداری شدند. در نهایت برای محاسبه قابلیت‌هضم ماده خشک، مایع‌رویی باقیمانده هر فالکون به آرامی تخلیه و پلت باقیمانده در کف، در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید تا مقدار ماده خشک باقیمانده تعیین گردد.

آزمایش دوم: تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

در این بخش از آزمایش کارایی سه جاذب آلومینوسیلیکاته با ساختار پایه بنتونیت سدیم بر سمیت‌زدایی AFB1 مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این مرحله از ۳ نوع جاذب با ساختار پایه آلومینوسیلیکاته، استفاده شد. جاذب میلباند (MilBond) بعنوان جاذب تجاری محصول شرکت Milwhite آمریکا انتخاب و تهیه گردید. جاذب‌های بومی با نام‌های تجاری مگاباند (MegaBond) و مایکوباند (MycoBond) از شرکت دانش بنیان مگافرآور تهیه شدند. در ابتدا به‌منظور یکنواختی، نمونه‌های مختلف جاذب با استفاده از الک با اندازه منافذ ۱۰۵μm (الک شماره ۱۴۰) غربال شدند و ذرات کوچکتر از این اندازه برای انجام آزمایش جداسازی گردید.

در این مرحله تیمارهای آزمایشی شامل افزودن جاذب‌های آلومینوسیلیکاته (۶ درصد ماده خشک خوراک پایه)، با و بدون افزودن AFB1 (به مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت) در روش کشت ثابت بودند. در این مرحله نیز انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. بدین‌منظور ۵۰۰ میلی‌گرم از خوراک پایه داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری مخصوص، ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. سپس مقدار ۳۰ میلی‌گرم از جاذب‌های مختلف توزین شده و به شیشه‌های مورد نظر حاوی ماده خوراکی اضافه شد. از طرف دیگر یک میلی‌لیتر از محلول AFB1 با غلظت ۳۰/۶ به شیشه‌های مورد نظر تزریق شد (تا غلظت ۶۰۰ نانوگرم از AFB1 در میلی‌لیتر محیط کشت بدست آید) و یک میلی‌لیتر از آب متانولی رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمارهای فاقد AFB1، افزوده شد. سایر مراحل انکوباسیون و نمونه‌گیری مشابه به آزمایش اول بود.

آنالیز شیمیایی نمونه‌ها

غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه‌های مایع کشت بر اساس روش رنگ سنجی و بر طبق پروتکل برودریک و کانگ (۶) اندازه‌گیری شد. اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips- PU4410) و بر طبق پروتکل اوتنستین و بارتلی (۲۸) آنالیز شدند. در این دستگاه از ستونی (PEG۱۰) با طول ۴۵ متر (با قطر ۰/۴۵ میلی متر) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد و در دمای اولیه و پایانی به‌ترتیب روی ۵۵ و ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای دتکتور (FID) و انژکتور نیز ۲۵۰ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. کرتونیک اسید (۱:۷ حجمی) به‌عنوان استاندارد داخلی به تمامی نمونه‌ها تزریق شد.

معادلات و روش‌های آماری

از مدل نمایی با فاز تأخیر شوفیلد (۳۶) برای برازش داده‌های تولید گاز با به کارگیری روش مقایسات گوسن - نیوتن در رویه NLIN نرم افزار آماری SAS (۳۵) به شیوه رگرسیون غیر خطی استفاده گردید.

$$P=v(1-\exp(-k^{(t-lag)}))$$

در این مدل P گاز تولیدی در زمان t، v گاز مرتبط با سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر، k نرخ تولید گاز در زمان و lag با مفهوم زمان مربوط به فاز تأخیر به کار رفت.

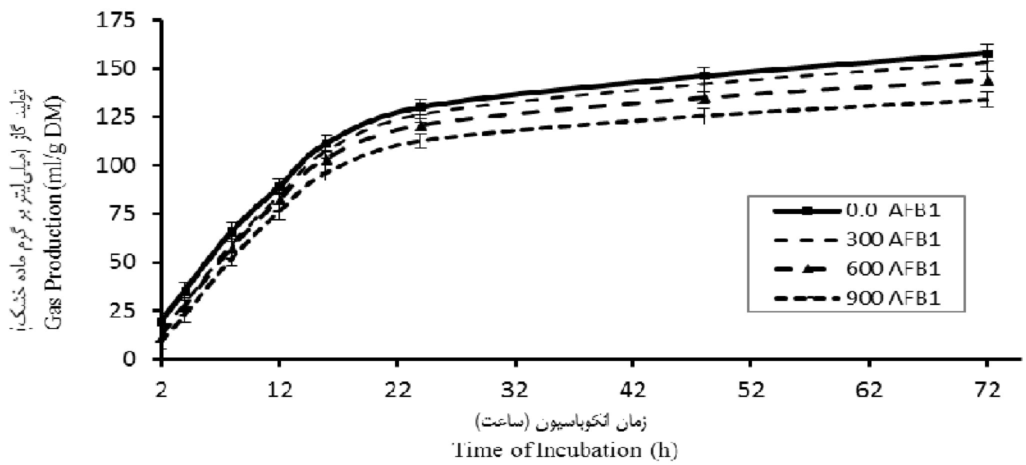
فراسنجه‌های تولید گاز و سایر نتایج (غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار و قابلیت‌هضم ماده خشک) با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۳۵) و طرح کاملاً تصادفی به‌صورت زیر مورد تجزیه آماری قرار گرفت. میانگین مشاهدات توسط Lsmeans در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند. مدل آماری طرح به این صورت بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این مدل Y_{ij}: مشاهده i در تیمار j، μ: میانگین کل مشاهدات، T_i: اثر تیمار i و e_{ij} : خطای تصادفی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تأثیر مقادیر افزایشی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار و قابلیت‌هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 به محیط کشت، نرخ تولید گاز و پتانسیل تولید گاز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، به‌طوری که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز از ۰/۱۳۴ به ۰/۰۹۲ میلی‌لیتر در ساعت و پتانسیل تولید گاز از ۱۶۰/۷ میلی‌لیتر به ۱۳۱/۳ کاهش یافت، ولی تفاوت معنی‌داری بین مقادیر صفر و ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. علاوه بر این فاز تاخیر تولید گاز به‌طور معنی‌داری با افزایش AFB1، افزایش یافت (P<۰/۰۵) و از ۰/۰۷ ساعت در مقدار صفر AFB1 به ۱/۳۹ ساعت در بالاترین مقدار تزریق AFB1 افزایش یافت، با این وجود تفاوت معنی‌داری بین مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 مشاهده نشد. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، جیانگ و همکاران (۱۹) و همچنین هِلفریچ و همکاران (۱۶،۱۷) گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این ممانعت از تولید گاز بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت‌تأثیر AFB1 می‌باشد.



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 (صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) بر الگوی تولید گاز

Figure 1- Effect of different levels of aflatoxin B1 (0, 300, 600 and 900 ng/ml) on gas production pattern

افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH آن نداشت، ولی قابلیت‌هضم ماده خشک به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) با افزایش غلظتAFB1 کاهش یافت (جدول ۲). قابلیت‌هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت از ۰/۵۹۳ در تیمار فاقد AFB1 به ۰/۵۵۴ در تیمار حاوی ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیترAFB1 رسید ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی صفر و ۳۰۰ و همچنین بین تیمارهای حاوی ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. نتایج گزارش شده در مورد تأثیرAFB1 بر قابلیت هضم ماده خشک متناقض است. نتایج این آزمایش یافته‌های وستلیک و همکاران (۴۱) را تایید می‌نماید. فِهر و دِلاگ (۱۳) و اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش هضم سلولز شد. از طرف دیگر جیانگ و همکاران (۱۹) و پترسون و کِسلینگ (۳۰) گزارش کردند که افزودن AFB1 بر قابلیت‌هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی، تأثیری نداشت. در آزمایش حاضر کاهش مشاهده شده در قابلیت‌هضم ماده خشک در اثر افزودنAFB1 می‌تواند درنتیجه‌ی اختلال در فعالیت میکروارگانیسم های شکمبه از طریق کاهش هضم فیبر و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار باشد (۱۳،۱۶،۱۷).

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت، به‌طوری که کمترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 (به‌ترتیب ۱۵/۲ و ۱۵/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) مشاهده شد. نتایج بدست آمده در این آزمایش درباره غلظت نیتروژن آمونیاکی، تا حدود زیادی با نتایج دیگر محققان (۱۳،۱۹،۳۷) مطابقت دارد. این پژوهشگران گزارش کردند که افزودن AFB1 در یک سیستم شکمبه مصنوعی موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید. آفلاتوکسین B1 ممکن است سنتز پروتئین میکروبی را مختل کرده و احتیاجات میکروب‌ها به مواد مغذی را افزایش دهد (۱۲) در شکمبه، پروتئین خوراک معمولا توسط میکرواگانیسم‌ها هیدرولیز و آمین‌زدایی شده و

درنهایت پپتیدها و آمونیاک آزاد را تشکیل می‌دهد (۳۲) حال اگر هضم و متابولیسم پروتئین خوراک توسط AFB1 مهار گردد، غلظت آمونیاک آزاد در شکمبه کاهش خواهد یافت. مقدار آمونیاک آزاد در شکمبه نتیجه‌ی تعادل بین هیدرولیز پروتئین (تولید آمونیاک) و جذب و مصرف آن (توسط شکمبه و میکروب‌ها) است (۳۲). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش AFB1 در مطالعه حاضر، ممکن است به‌دلیل اثرات منفی AFB1 بر میکروارگانیسم‌ها و درنتیجه مهار یا محدود شدن مسیر هیدرولیز یا آمین‌زدایی پروتئین (کاهش آزادسازی آمونیاک از خوراک)، باشد.

در این آزمایش، غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش مقدار AFB1 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما نسبت مولی اسیدهای چرب فرار شامل استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزووالرات تحت تأثیر مقدار AFB1 قرار نگرفتند (P>۰/۰۵) که با نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی، تاحدی متناقض است. ادرینگتون و همکاران (۱۲) تفاوتی در غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی‌گرم AFB1 در کیلوگرم جیره مشاهده نکردند. هِلفریچ و همکاران (۱۶) نیز گزارش کردند که افزودن ۶۰۰–۶۰ میکروگرم در کیلوگرم AFB1 به جیره گوساله‌های نر، تأثیری بر تولیدی اسیدهای چرب فرار نداشت. در آزمایشی دیگر تغذیه ۰/۷۱۴ میکرومول AFB1 به بزهای شیرده، بر تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه ای تأثیری نگذاشت (۱۷). در مقابل، هضم سلولز، تولید اسیدهای چرب فرار، غلظت نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پروتئین‌ها با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی AFB1 به گوساله‌های نر و در شرایط آفلاتوکسیکوز حاد گاوی، کاهش یافت (۸). اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه می‌گردد. فِهر و دِلاگ (۱۳) نیز مشاهده کردند که مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از ۰/۲میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شد. همچنین نسبت اسیدهای چرب فرار تغییر کرد بگونه‌ای که استات کاهش و پروپیونات و بوتیرات افزایش یافتند اما نسبت والرات تغییری نکرد. دِووراک و همکاران (۱۱) نیز با انجام آزمایشی در شرایط درون‌تنی مشاهده کردند که یک بار تزریق ۲۰۰ میلی‌گرم AFB1 و ۸۰ میلی‌گرم AFB2 به داخل فیستولای یک گاو موجب کاهش نسبت استات، افزایش بوتیرات و نسبت‌های متغیری پروپیونات گردید. در توجیه نتایج بدست آمده در این آزمایش می‌توان گفت که تغییر الگوی جمعیت و فعالیت میکروبی در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت، ممکن است بر جنبه‌های دیگری از ظرفیت تخمیر شکمبه مانند تولید اسیدهای چرب فرار، تأثیرگذار باشد.

اختلاف زیاد مشاهده شده بین گزارشات مختلف ممکن است به‌دلیل تفاوت‌ها در تکنیک مورد استفاده، مقادیر مختلف AFB1 و یا منبع آلودگی آفلاتوکسین مورد استفاده باشد. به‌عنوان مثال در روش استفاده شده توسط فِهر و دِلاگ (۱۳)، ۲۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه به مدت ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت، درحالی‌که پِترسون و کِسلینگ (۳۰) از یک میلی‌لیتر مایع شکمبه به همراه سوبسترا و به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون، استفاده کردند. مدت زمان انکوباسیون طولانی و مقدار کم مایع شکمبه اولیه می‌تواند منجر به جمعیت میکروبی محدود و انتخاب شده ای گردد که ممکن است نشان دهنده شرایط واقعی شکمبه نباشد. به علاوه اینکه تخمیر طولانی مدت می‌تواند موجب محو شدن نتایج بدست آمده در سیستم‌های کشت برون‌تنی گردد، زیرا تفاوت‌های اولیه در نرخ و مقدار هضم از بین خواهد رفت. از طرف دیگر تقریبا به‌طور قطع می‌توان گفت که برخی از دیگر عوامل ضد میکروبی و مایکوتوکسین‌ها، علاوه بر AFB1، و همچنین برخی از مایکوتوکسین‌های غیر قابل تشخیص در خوراک و یا عصاره‌های خام آسپرژیلوس فلاووس مورد استفاده، وجود دارد. این عامل می‌تواند تفاوت در اثرات مشاهده شده در مطالعات با خوراک آلوده شده طبیعی در مقایسه با آزمایشات با مایکوتوکسین‌های خالص را توضیح دهد (۲۲،۲۱).

به‌طورکلی در این آزمایش افزودنAFB1 موجب کاهش تولید گاز (نرخ و کل تولید گاز)، کاهش قابلیت‌هضم خوراک و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی گردید که این نتایج می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت کنندگیAFB1 بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد. ماتِر و همکاران (۲۵) مشاهده کردند که آفلاتوکسین باعث مهار کشت‌های خالص استرپتوکوکوس بویس و مخلوط باکتری‌های شکمبه می‌گردد. اگرچه که مقدار مصرفی AFB1 در این آزمایش (۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، بسیار بیشتر از مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار در شکمبه حیوانات تغذیه شده با AFB1 می‌باشد، دیگر محققان ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها در مقادیر بسیار کمتر را نیز مشاهده کرده‌اند. بورمیستر و هسلتاین (۷) از عصاره خام آفلاتوکسین شامل ۳۶ درصد کل آفلاتوکسین و ۲۴ درصد AFB1 استفاده کردند و حساسیت باکتری‌ها را نسبت به آفلاتوکسین‌ها بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که از ۳۲۹ میکروارگانیسم آزمایش شده، رشد ۱۲ گونه از باسیلوس‌ها، یک گونه از کلستریدیوم و یک گونه از استرپتومایسس تحت تأثیر آفلاتوکسین محدود می‌شود. نتایج آزمایشات دیگر ثابت کرد که AFB1 عامل اصلی تأثیرات ضد میکروبی مشاهده شده توسط عصاره خام آفلاتوکسین می‌باشد. با فرض اینکه AFB1 عامل اصلی اثرات ضدمیکروبی در عصاره‌های خام آفلاتوکسین می‌باشد، بورمیستر و هسلتاین (۷) ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها را با ۷–۸ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، مشاهده کردند. ازآنجا که نشان داده شده که چندین گونه باکتریایی با غلظت‌های کمتر از۱۰ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، به‌صورت کامل ممانعت می‌شوند، منطقی خواهد بود اگر فرض کنیم که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه

می‌تواند با مقادیر آفلاتوکسین مشاهده شده به‌صورت معمول در مزرعه، مختل گردد (۲۶). بنابراین ازآنجا که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند اثرات ضد میکروبی (تخریب میکروب و یا ممانعت و کاهش رشد آن‌ها) داشته باشند، ممکن است باعث تغییر نسبت‌های محصولات نهایی هضم و مختل شدن شکمبه گردیده و درنتیجه هضم، مصرف خوراک و درنهایت تولید حیوان را مختل نمایند (۲۶).

جدول۲– تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 2- Effect of different levels of Aflatoxin B1 on gas production parameters, fermentation and rumen degradability

فراسنجه Parameters	غلظت آفلاتوکسین B1 در محیط کشت (نانوگرم در میلی‌لیتر)[1] Aflatoxin B1 levels in the culture (ng/ml)[1] 0	300	600	900	SEM	P-Value
نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر بر ساعت) Gas production rate (ml/h)	0.134^{a}	0.121^{b}	0.107^{c}	0.092^{d}	0.005	0.031
تولید گاز (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک) Gas production (ml/gr DM)	160.7^{a}	154.1^{a}	142.0^{b}	131.3^{c}	4.1	0.012
فاز تأخیر (ساعت) Lag time (h)	0.07^{c}	0.64^{b}	1.03^{a}	1.39^{a}	0.27	0.019
فراسنجه‌های تخمیر و هضم (در ۲۴ ساعت) Fermentation and digestion parameters (over 24 hours)						
pH	6.63	6.58	6.61	6.54	0.09	0.43
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک) Dry matter digestibility (g/g DM)	0.593^{a}	0.584^{a}	0.560^{b}	0.554^{b}	0.011	0.023
غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) N-NH3 (mg/dL)	17.8^{a}	16.9^{b}	15.2^{c}	15.3^{c}	0.34	0.04
کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول بر لیتر) Total VFA (mM/l)	83.6^{a}	77.2^{b}	71.7^{c}	60.8^{d}	2.1	0.014
استات(میلی‌مول بر لیتر) Acetate (mM/l)	67.5	68.1	67.4	67.8	0.52	0.17
پروپیونات (میلی‌مول بر لیتر) Propionate (mM/l)	18.8	18.1	19.0	18.4	0.4	0.11
بوتیرات (میلی‌مول بر لیتر) Butyrate (mM/l)	9.6	9.7	9.3	9.6	0.36	0.37
والرات (میلی‌مول بر لیتر) Valerate (mM/l)	2.44	2.51	2.59	2.47	0.081	0.16
ایزووالرات (میلی‌مول بر لیتر) Isovalerate (mM/l)	1.66	1.58	1.71	1.72	0.077	0.13

داده‌های مربوط به تأثیر متقابل AFB1 و جاذب‌های آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مرحله فرض بر این بود که جاذب‌های سم، مولکول‌های AFB1 را در محیط کشت شکمبه جذب کرده و بدین ترتیب اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم شکمبه را حذف نموده و یا کاهش می‌دهند. لذا در این آزمایش AFB1 و ترکیبات جاذب سم در یک زمان، به‌صورت جدا و یا باهم به یک سیستم کشت ثابت در شرایط برون‌تنی اضافه شدند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات قبلی، مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 و همچنین مقدار ۶ درصد جاذب‌های آلومینوسیلیکاته، جهت انجام آزمایش انتخاب شدند.

نتایج بدست آمده نشان داد که مشابه با یافته‌های مرحله قبل، به‌طورکلی افزودن AFB1 به محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابلیت‌هضم ماده خشک و غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید (P<۰/۰۵)، درحالی‌که اثر معنی‌داری بر pH محیط کشت نداشت (P>۰/۰۵). از طرف دیگر افزودن جاذب‌های آلومینوسیلیکاته مختلف به‌طورکلی موجب کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابل‌توجه قابلیت‌هضم ماده خشک و غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید (P<۰/۰۵)، و علاوه بر این موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت در تمامی تیمارهای حاوی جاذب شدند (P<۰/۰۵). در توافق با نتایج این آزمایش جاسکوز و همکاران (۱۸) گزارش کردند که افزودن ۲ یا ۱۰ درصد بنتونیت سدیم به جیره

گاوهای شیرده، باعث کاهش تجزیه پذیری ماده خشک گردید، امـا، صـالح (۳۳) گـزارش کـرد کـه اسـتفاده از ۲/۵ درصـد جـاذب آلومینوسیلیکاته در جیره، باعث افزایش معنی‌دار ناپدیـد شـدن مـاده خشک می‌گردد.

نتایج گزارش شده قبلی در ارتباط با تأثیر جاذب آلومینوسـیلیکاته بنتونیت بر pH و غلظـت نیتـروژن آمونیـاکی شـکمبه، تـا حـدودی متناقض است. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، آیتچیسون و همکـاران (۴) بـا بررسـی تـأثیر بنتونیـت بـر تخمیـر شـکمبه و قابلیت‌هضم، گزارش کردند که افـزودن بنتونیـت بـه جیـره موجـب افزایش pH نسبت به گـروه شـاهد گردیـد. از طـرف دیگـر، برخـی محققان گزارش کردند که افزودن مقادیر مختلف بنتونیت سـدیم بـه جیره، تأثیری بر pH شکمبه نداشت (۳۷،۹،۳). افزایش معنـی‌دار pH محیط کشت با افزودن جاذب‌های بنتونیتی می‌تواند به این دلیل باشد که بنتونیت به‌دلیل داشتن کاتیون‌های قابل تعویض با یون هیدروژن، به‌عنوان تعدیل کننده یون هیدروژن در محیط عمل نموده و از کاهش شدید pH شکمبه جلوگیری می‌نماید.

عبدالرحمان و هلال (۱) گـزارش کردنـد کـه افـزودن ۴ درصـد بنتونیت به جیره میش‌های شیرده موجب کـاهش معنـی‌دار غلظـت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گردید. عبـدالله و همکـاران (۲) نیـز بیـان کردند که اضافه کردن بنتونیت به میزان ۲درصد به کنجاله خرمـای روغنی سبب کاهش جمعیت پروتـوزایی و کـاهش غلظـت نیتـروژن آمونیاکی در شکمبه شد. صالح و بنف (۳۴) گزارش کردند که بنتونیت سدیم قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالاست، آن را جذب کرده و پس از کاهش غلظت آن در محیط، شروع به آزادسازی مجدد آن می‌کند. بنابراین افزودن بنتونیت سدیم به جیره می‌تواند تا حدودی دسترسی میکروارگانیسم‌ها به نیتروژن را متعادل سـاخته و همچنـین به‌عنوان یک ماده افزودنی بـا ارزش در جهـت بهبـود ارزش غـذایی خوراک مورد توجه قرار بگیرد (۱۴). همچنین والاس و نیوبولـد (۴۰) گزارش کردند که افزودن بنتونیت سدیم بـه جیـره، موجـب کـاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد گردید. ویلیامز و ویترز (۴۲) بیان کردند که احتمالاً بنتونیت سدیم از طریق کاهش جمعیـت پروتوزوایی (۴۱) و به تبع آن افزایش جمعیت باکتری‌هـای شـکمبه، موجب برداشت بیشتری از نیتروژن آمونیاکی توسط میکروارگانیسم‌ها شده و درنهایت غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش می‌یابد.

اعتقاد بر این است که بنتونیت ها، قـادر بـه جـذب و رهاسـازی دوباره پروتئین‌ها و سایر سوبستراهای نیتروژنه هستند، از این رو وقتی که تجمع آمونیاک در شکمبه بالا باشد، آن را جذب کرده و زمانی که غلظت آمونیاک کاهش یابد، مقدار زیادی از آن را آزاد مـی کننـد و از این طریق باعث افزایش راندمان اسـتفاده از آمونیـاک و پـروتئین در شکمبه می شوند.گروهی از محققان در دانشگاه تگزاس گزارش کردند که مکانیسم اصلی جذب مولکول AFB1 توسط مونتموریلنیـت‌هـا از طریق واکـنش‌هـای گیرنـده/دهنـدگی الکتـرون مـی‌باشـد (۳۱،۱۰) به طوری که گروه کربونیـل مولکـول AFB1 یـک سیسـتم غنـی از الکترون بوده و می توانـد بـا کـاتیون هـای قابـل تبـادل در سـاختار مونتموریلنیت تشـکیل کمـپلکس پایـدار دهـد. از طـرف دیگـر ایـن محققان بیان نمودند که مولکول‌های AFB1 عمدتاً در لبه‌ها و سطح پایه و همچنین فضـاهای بـین لایـه‌ای ذرات مونتموریلنیـت جـذب می‌گردند. مقایسه بین جاذب‌های آلومینوسیلیکاته مختلف بیان می‌کند که تیمار حاوی جاذب میلباند، قابلیت هضم ماده خشک، نرخ و مقدار تولید گـاز بـالاتر ($P<0/05$) و غلظـت نیتـروژن آمونیـاکی کمتـری ($P<0/05$) نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند و مایکوبانـد داشت، ولی بین تیمارهای حاوی جـاذب هـای مگابانـد و مایکوبانـد، اختلاف معنی داری وجود نداشـت ($P>0/05$)، بـا ایـن وجـود از نظـر عددی، تیمارهای حاوی جاذب مایکوباند، قابلیت‌هضم مـاده خشـک، نرخ و مقدار تولید گاز بالاتر و غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌ های مگاباند داشتند. در عین حال هیچ‌گونه اختلاف معنی داری در pH محیط کشت، بـین جـاذب‌هـای مختلـف مشاهده نشد ($P>0/05$). تفاوت‌های مشاهده شده در تأثیر نمونه‌های مختلف جاذب‌های بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه می توانـد بـه دلیـل نـوع بنتونیـت مـورد اسـتفاده، خلـوص و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت آن‌ها باشد (۲۹).

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز ، پتانسیل تولید گاز، غلظـت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش می‌یابـد، ولـی pH محـیط کشت تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. همچنین، هیچکـدام از جـاذب‌هـای آلومینوسیلیکاته نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه ای در شرایط برون‌تنی را خنثی نمـوده و یا کاهش دهند که می‌تواند به‌دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکاته برای جذب AFB1 باشد. نتایج ایـن پـژوهش بیـان می‌کند که احتمالاً جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

جدول ۳- تأثیر آفلاتوکسین B1 و نمونه‌های جاذب بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 3. Effect of aflatoxin B1 and bentonite adsorbent on the parameters of gas production, fermentation and rumen digestion

فراسنجه‌ها Parameters	جاذب Adsorbent	—		مگاباند MegaBond		مایکوباند MycoBond		میلباند MilBond		SEM	P-Value
	AFB1	—	AFB1	—	AFB1	—	AFB1	—	AFB1		
فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters											
نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر بر ساعت) Gas production rate (ml/h)		0.143^{a}	0.128^{bc}	0.121^{cd}	0.110^{e}	0.124^{c}	0.115^{de}	0.134^{b}	0.122^{cd}	0.003	0.044
تولید گاز (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک) Gas production		163.7^{a}	146.9^{bc}	139.5^{cd}	126.4^{e}	143.2^{c}	132.1^{de}	152.6^{b}	140.4^{cd}	3.80	0.021
فراسنجه‌های تخمیر و هضم (در ۲۴ ساعت) Parameters of fermentation and digestibility (24h)											
pH		6.53^{b}	6.57^{b}	6.80^{a}	6.74^{a}	6.79^{a}	6.77^{a}	6.73^{a}	6.75^{a}	0.04	0.038
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک) Dry matter digestibility (g/1g DM)		0.58^{a}	0.55^{bc}	0.51^{de}	0.48^{f}	0.53^{cd}	0.50^{ef}	0.55^{b}	0.52^{de}	0.01	0.024
غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) N-NH3 (mg/dL)		18.3^{a}	16.7^{b}	16.9^{b}	15.8^{cd}	16.4^{bc}	15.3^{d}	15.5^{d}	15.1^{d}	0.41	0.033

* تیمارهای آزمایشی بر اساس افزودن سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، مایکوباند و میلباند به مقدار ۶ درصد ماده خشک خوراک پایه، و افزودن آفلاتوکسین B1 (به مقادیر صفر و ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت) تنظیم شدند

منابع

1- Abdel-Rahman, F. I. S, and K. A. Helal. 2010. Productive Performance of lactating ewes fed diets supplementing with dry yeast and or bentonite as feed additives. World Journal of Agricultural Sciences, 6:43-53.

2- Abdullah, N., H. Hanita, Y. W. Ho, H. Kudo, S. Jalaludin, and M. Ivan. 1995. The effects of bentonite on rumen protozoa population and rumen fluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. Asian Australian Journal of Animal Science, 8:249-254.

3- Aghashahi, A., A. Nikkhah, S. A. Mirhadi., M. Zahedifar, and H. Mansouri. 2005. Effects of different level of unprocessed bentonite, processed bentonite, and clinoptilolite at different rumen degradable protein level, on ammonia concentration, soluble and digestible protein (*in-vitro*). Pajouhesh and Sazandegi, 70: 80-90. (In Persian).

4- Aitchison, E. M., J. B. Rowe, and G. S. Rix. 1986. Effect of bentonite clays on rumen fermentation and diet digestibility. Procceding of Nutrition Society. Procceding of Nutrition Society, 11:111-114.

5- Arroquy, J. I., R. C. Cochran., T. G. Nagaraja, E. C. Titgemeyer, and D. E. Johnson. 2005. Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. Animal Feed Science and Technology, 120:93-106.

6- Broderick, G. A, and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63:64-75.

7- Burmeister, H. R, and C. W. Hesseltine. 1966. Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. Applied Microbiology, 14: 403-404.

8- Cook, W. O., J. L. Richard, G. D. Osweiller, and D. W. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. American Journal of Veterinary Research, 47:1817-1825.

9- Davison, T. M, and W. K. Ehrlich. 1997. Adding bentonite to sorghum grain-based supplements has no effect on cow milk production. Australian Journal of Experimental Agriculture, 37:505-508.

10- Deng, Y., A. L. Barrientos Velazquez, F. Billes, and J. B. Dixon. 2010. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. Applied Clay Science, 50: 92-98.

11- Dvorak, R, and P. Jagos. 1977. Changes of the clinico-biochemical indices in the rumirid juice and urine in experimental aflatoxicosis of dairy cows. Veterinary Medicine, 22:161-169.

12- Edrington, T. S., R. B. Harvey, and L. F. Kubena. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. Journal of Animal Science, 72:1274-1281.

13- Fehr, P. M, and J. Delage. 1970. Effect de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. C.R. Academy Science Paris, 270:550-553.

14- Fenn, P. D, and R. A. Leng. 1989. Wool growth and sulfur amino acid entry rate in sheep fed roughage-based diets supplemented with bentonite and sulfur amino acids. Australian Journal of Agriculture Research, 40:889-896.

15- Harvey, R. B., L. F. Kubena, T. D. Phillips, D. E. Corrier, M.H. Elissalde, and W.E. Huff. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. Journal of Veterinary Research, 52:152-156.

16- Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. H. Hsieh. 1986. [14C]-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats. Journal of Animal Science, 62:697-705.

17- Helferich, W. G., W. N. Garrett, D. P. H. Hsieh, and R.L. Baldwin. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. Journal of Animal Science, 62: 691-696.

18- Jacques, K. A., D. E. Axe., T.R. Harris, and D. L. Harmon. 1986. Effect of sodium bicarbonate and sodium bentonite on digestion, solid and liquid flow, and ruminal fermentation characteristics of forage sorghum silage-based diets fed to steers. Journal of Animal Science, 63:923-932.

19- Jiang, Y. H., H. J. Yang, and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. Animal Feed Science and Technology, 175:85-89.

20- Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food additives and contaminants. Thirty-third session. 2001 Mar 12-16; The Netherlands 11.

21- Korosteleva, S. N., T. K., Smith, and H. J Boermans. 2007. Effects of feedborne Fusarium mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. Journal of Dairy Science, 90:3867-3873.

22- Korosteleva, S. N., T. K. Smith, and H. J. Boermans. 2009. Effects of feed naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. Journal of Dairy Science, 92:1585-1593.

23- Lindemann, M. D., D. J. Blodgett, E. T. Kornegay, and G. G. Schurig. 1993. Potential amelioratiors of aflatoxicosis in weanling/growing swine. Journal of Animal Science, 71:171-178.

24- Masimango, N., J. Remacle, and J. L. Ramaut. 1978. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B1 from contaminated media. European Journal of Applied Microbiology 6:101-105.

25- Mathur, C. F, and R. C. Smith. 1976. Growth and morphology of Streptococcus bovis and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B1, in vitro. Journal of Dairy Science 59:455-458.

26- Mertens, D. R. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In Proc. Interaction of Mycotoxins in Animal Production. National Academy Science, Washington, DC.

27- Morgavi, D., H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. In: Oswald IP, Taranu I. Mycotoxins in Farm Animals. Transword Research Network, Kerala, India.

28- Ottenstein, D. M., and D. A. Bartley. 1971. Determination of rumen VFA. Analytical Chemistry, 43:952-955.

29- Papaioannou, D., P. D. Katsoulos, and H. Karatzias. 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatement of certain farm animal diseases: a review. Microporous and mesoporous materials, 84:161-170.

30- Pettersson, H, and K. H. Kiessling. 1976. Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and sterigmatocystin on

microorganisms from sheep rumen. Swedden Journal of Agriculture Research, 6: 161.

31- Phillips, T. D., A. B. Sarr, and P. G. Grant. 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. Natural Toxins, 3:204-213.

32- Reynal, S. M., I. R. Ipharraguerre, M. Lin˜eiro, A. F. Brito, G. A Broderick, and J. H. Clark. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. Journal of Dairy Science, 90:1887-1903.

33- Saleh, M. S. 1994. Using of feed additives for feeding farm animals, Tanta University, Egypt.

34- Saleh, M. S, and A. B. Bonf. 2000. Bentonite supplementation to concentrate for buffaloes. Egyptian Journal of Nutrition and Feed, 6:67-78.

35- SAS Institute Inc. 2009. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, S. I., Cary, NC, USA.

36- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. Journal of Animal Science, 72:2980-2991.

37- Scudamore, K. A., and C. T. Livesey. 1998. Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: A Review. Journal of Science and Food Agriculture, 77:1-17.

38- Stephenson, R. G. A., J. L. Huff, G. Krebs, and C. J. Howitt. 1992. Effect of molasses, sodium bentonite and zeolite on urea toxicity. Australian Journal of Agricultural Research, 43:301-314.

39- Theodorou, M. K, and B. A. Williams. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48:185-197.

40- Wallace, R. J, and C. J. Newbold. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. Animal Feed Science and Technology, 116:163-168.

41- Westlake, K., R. I. Mackie, and M. F. Dutton. 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. Animal Feed Science and Technology, 25:169-178.

42- Williams, A. G, and S. E. Withers. 1993. Changes in the rumen microbial populations and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. Canadian Journal of Microbiology, 31:61-69.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 3, Fall 2020, p. 277-289

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۲۸۹-۲۷۷

Effect of Aflatoxin B1 and Aluminosilicate Toxin Adsorbents on the Parameters of Gas Production, Fermentation and Ruminal Digestion (*in vitro*)

M. Mojtahedi [1*]– M. Danesh Mesgaran [2]- M. Hayati-Ashtiani[3]- S. A. Vakili[4]- S. M. Vaghar Seyedin[5]

Submitted: 07-10-2018
Accepted: 03-11-2019

Introduction: When aflatoxin contaminated food is given to lactating animals, the metabolite of aflatoxin, called M, is secreted in milk. Since pasteurization, sterilization, and milk processing have little effect on the survival and reduction of AFM1 toxicity, this poison ultimately transports to various dairy products and endangers consumer health. Along with the negative effects of mycotoxins on health and livestock products, these compounds can to be effective in digestion, metabolism and ruminal microbial populations. In ruminants (especially lactating cows) fed with AFB1 contaminated feeds, health problems such as liver cancer, reduce immunity, reproductive disorders, malformation, decreased feed intake and milk production have also been reported. An increase in liver enzymes can be attributed to the signs of an abnormal body. In addition, previous studies aluminosilicate has been show to tightly bind aflatoxins *in vitro*. This significantly reduce mortality and morbidity in animals, decrease molecular biomarkers of aflatoxin exposure in humans and animals.

Materials and Methods: Two experiments were conducted to investigate the effect of aflatoxin B1 and aluminosilicate toxin adsorbents on the parameters of gas production contains gas production potential (b) and gas production rate (c), *in vitro* fermentation parameters includes pH, ammonia nitrogen concentration, volatile fatty acids and ruminal digestion. In the first experiment, the effects of different levels of AFB1, including 0, 300, 600 and 900 ng/ml, were investigated on the parameters of gas production, fermentation and digestion using batch culture method. In the second experiment the effectiveness of three aluminosilicate adsorbents on the AFB1 detoxification was investigated. MegaBond and MycoBond as native adsorbents and MilBond as a commercial adsorbent were used in 6% of DM. The gas produced was recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 h of the incubation. The data obtained were fitted to the non-linear equation to calculate parameters of gas production. Also, at the end of 24 h incubation, four bottles were transferred to refrigerator to stop fermentation. Then, pH, ammonia nitrogen concentration and volatile fatty acid (VFA) of batch culture medium was measured, as well as the dry matter digestibility.

Results and Discussion: Results of first experiment indicated that with increasing the AFB1 from 0.0 to 900 ng/ml, the gas production rate (c) decreased from 0.134 to 0.092 ml/h and the gas production potential (b) decreased from 160.7 to 131.3, but there was no significant difference between the treatments 0 and 300 ng/ml AFB1. In addition, the gas production lag phase increased significantly with increasing level of AFB1 ($P<0.05$). Addition of AFB1 to the batch culture did not affect its pH, but the dry matter digestibility significantly decreased ($P<0.05$) with increasing AFB1. Ammonia nitrogen concentration decreased significantly ($P<0.05$) with AFB1 addition, so that the lowest concentration of ammonia nitrogen was observed at 600 and 900 ng/ml AFB1 (15.2 and 15.3 mg/dL, respectively). In this experiment the total VFA concentration decreased significantly with AFB1 ($P<0.05$), but the molar ratio of acetate, propionate, butyrate, valerate and isovalerate was not affected ($P>0.05$). In the second addition of different aluminosilicate adsorbents significantly reduced the rate and potential of gas production. Likewise, dry matter digestibility and ammonia nitrogen concentration reduced significantly ($P<0.05$). Significant increase in pH of the culture medium by addition of aluminosilicate adsorbents can be attributed to the fact that aluminosilicate acts as a modifier of hydrogen ion in the environment due to the replacement of cations with hydrogen ion and prevents a significant decrease in rumen pH. Probably lowering the ammonia nitrogen concentration is due to the fact that the protozoan population is affected by aluminosilicate adsorbent and decreases; consequently, the population of the ruminal bacteria increases, which results in the removal of more ammonia nitrogen by microorganisms, and ultimately the concentration ammonia nitrogen decreases in the rumen.

Conclusion: The results of this study showed that AFB1 reduced gas production rate (c), the gas production potential (b), the concentration of ammonia and digestibility, but the pH is not affected *in vitro*. Also, none of the adsorbents was able to neutralize or reduce the negative effects of AFB1 on the parameters of gas production,

fermentation and rumen digestion, which could be due to the absorption mechanism of aluminosilicate adsorbents for AFB1 absorption. The results of this study indicate that adsorbents cannot reduce the negative effects of AFB1 on digestion and rumen fermentation, therefore only proposed strategy is to prevent the contamination animal feed with mycotoxins.

Keywords: Adsorption aluminosilicate, Aflatoxin, *in vitro*, Ruminal fermentation.